Introducção ao estudo da evolução dos ENDOTREMATODES BRASILEIROS

pelo

Dr. ADOLPHO LUTZ.

Introducção.

Tenciono apresentar nestas Memorias um resumo de estudos, que fiz no Instituto OSWALDO CRUZ sobre a evolução de endotrematodes, observados com maior frequencia em material colhido na visinhança ou vindo de fóra. Para facilitar a comprehensão destas notas darei uma introducção, referindo-me principalmente aos estados evolutivos e aos processos usados no estudo e insistindo mais nos pontos menos conhecidos ou novos. Os factos geraes em relação aos trematodes (que são encontrados em qualquer tratado de zoologia ou parasitologia) serão apenas occasionalmente mencionados.

O numero de trematodes adultos, occorrendo no Brasil e estudados por auctores extrangeiros, já é bastante grande. Mais numerosas ainda são as especies denominadas e superficialmente descriptas. Ha tambem um numero, ainda bem limitado, de trabalhos nacionaes. Como era de prever, verificou-se que esta parte da fauna nacional é tambem muito rica e varia . ' isto demonstrado pelas grandes colleções, feitas por NATTERER e aproveitadas extensamente nos estudos citados.

De outro lado reina um profundo silencio sobre o cyclo evolutivo destas especies, tanto na litteratura extrangeira como nos trabalhos nacionaes. Actualmente só posso me lembrar da descripção, dada por PIRAJÁ, da *Cercaria Blanchardi* que parece pertencer ao *Schistosomum Mansoni,* parasito provavelmente introduzido, e uma descripção de uma *Tetracotyle* da Venezuela. Ambos os trabalhos são apenas descriptivos e não procuram elucidar a historia evolutiva destes parasitos.

Já é tempo de occupar-se um pouco com este assumpto, mais importante que a mera descripção de novas especies. Os estudos sobre as antecedencias evolutivas dos entozoarios não têm sómente grande importancia pratica para a prophylaxia, mas são tambem do mais alto interesse scientifico. Não ha nada de mais fascinante que a observação destas historias evolutivas, complicadas pela mudança de hospedadores e

facilitadas por numerosas adaptações extremamente curiosas. Tambem são um meio de confrontar o valor do agrupamento systematico das especies.

E' sabido que todos os trematodes digeneticos passam parte da sua evolução em molluscos, de preferencia nos de agua doce ou marinhos. Os molluscos marinhos são os primeiros hospedadores dos trematodes de peixes de mar ou de aves que frequentam as praias ou o alto mar. Os molluscos terrestres podem ser infeccionados pelas primeiras phases de parasitos de mammiferos ou aves que mostram adaptações especiaes, mas os factos desta ordem são comparativamente raros. Os molluscos marinhos são muito numerosos e muitas vezes difficeis de obter, o que não favorece a solução dos problemas que se referem á evolução dos trematodes de animaes marinhos. Ao contrario, os molluscos de agua doce pertencem a um numero limitado de especies, geralmente faceis de obter. Eliminando as especies pouco parasitadas, resta um numero limitado para o qual convergem numerosos trematodes, distribuidos em estado adulto sobre uma grande lista de hospedadores variados. Assim alguns caramujos de agua doce communs e abundantes servem de hospedadores intermediarios a maior numero de especies, das quaes algumas podem ser encontradas no mesmo individuo. Muitas vezes no material que parece, á primeira vista, conter uma unica especie, um exame minucioso permitte distinguir duas ou tres differentes.

Exame dos molluscos de agua doce.

É de toda conveniencia principiar estes estudos pelo exame dos molluscos de agua doce que são facilmente colhidos em estado vivo. Isolando maior numero de exemplares da mesma especie com pouca agua e expondo esta ao sol, se pode em pouco tempo determinar a sahida de cercarias.

Subdividindo este lote, chega-se, pouco a pouco, a determinar os exemplares infectados, onde se encontram as *parthenitas* (*redias e sporocystos)*. Conservando vivos os molluscos infectados se pode obter cercarias durante muito tempo.

É todavia impossivel, excluir a presença de trematodes apenas pelo exame de exemplares vivos. Não sómente as parthenitas que não chegáram ainda á producção de cercarias, só podem ser descobertas pelo exame directo, mas ha cercarias que são retidas e só escapam quando o mollusco hospedador morre. Isto se dá por exemplo no caso da *Fasciola hepatica.*

Determinação dos hospedadores intermediarios e definitivos.

O segundo hospedador é geralmente intermediario, raras vezes definitivo, como no caso dos schistosomos.

As cercarias servem para experiencias de determinação do segundo hospedador que pode ser mollusco, crustaceo, larva de insecto, verme, gyrino ou peixe. Collocando exemplares d'estes animaes na agua que contem as cercarias, se póde observar a infecção, seja directamente, seja por exame posterior. Os animaes de experiencia devem ser criados no laboratorio ou provir de um lote, no qual se pode excluir uma infecção anterior. No caso das cercarias que se enkystam no ambiente, procura-se observar o enkystamento ou encontrar os kystos depois de algumas horas. Convem usar para estas experiencias vidros de relogios ou crystallisadores, bastante pequenos para poder acompanhar a experiencia debaixo de um microscopio com augmento fraco.

As cercarias que penetram no segundo hospedador intermediario muitas vezes enkystam-se logo. Outras vezes conservam-se moveis durante algum tempo, antes do enkystamento. Livres ou enkystados, continuam a sua evolução por algum tempo, sem todavia attingir maturidade completa. Por esta razão a determinação experimental do hospedador definitivo só deve ser tentada alguns dias depois da infecção do hospedador secundario. Algumas vezes a organisação do trematode no hospedador intermediario per-

mitte advinhar o hospedador definitivo pela semelhança com os trematodes adultos, encontrados n'este, mas a prova definitiva é dada sómente pela experimentação helmintpologica. O resultado d'esta pode causar surprezas e conduzir á descoberta de novas especies.

Determinação dos trematodes adultos e do hospedador definitivo.

Determinado o segundo hospedador, quando elle é apenas intermediario, procura-se o hospedador definitivo. Este será um animal que se alimenta com o hospedador intermediarios, seja dentro da agua, seja mesmo fóra desta quando se trata de gyrino ou larva de insecto. Na metamorphose os parasitos destas larvas costumam passar para o insecto alado, que então pode ser apanhado por um passaro, um morcego ou mesmo por uma rã ou um sapo. Se o segundo hospedador fôr gyrino ou peixe, o definitivo será um animal que se alimenta com gyrinos, rãs, sapos ou peixes, como, por exemplo, cobras, peixes, aves ou, mais raramente, mammiferos.

Os kystos formados no ambiente infectam de preferencia aves aquaticas ou mammiferos, podendo estes ser herbivoros.

Sendo determinada a presença de cercarias em dado lugar, convem orientar-se sobre os animaes encontrados na mesma localidade. Tratando-se de pequenas collecções de aguas, a probabilidade será de haver entre os vertebrados em primeiro lugar: amphibios, em segundo: peixes e em terceiro: reptis (cobras); aves e mammiferos só costumam habitar collecções de agua mais extensas.

Nesses estudos aproveitam-se os conhecimentos, já adquiridos em outros lugares, e os que constam da litteratura helminthologica. Raras vezes, ás especies observadas serão identicas ás da Europa e da America do Norte. Na regra isso se dá apenas no caso de animaes domesticos ou introduzidos pelo homem, porque, geralmente, a fauna neotropica é bastante distincta. Os trematodes parasitarios todavia constituem uma excepção, por ter muitas especies em commum com a fauna européa e norte-americana; outras pouco differem das suas formas typicas, mesmo quando os hospedadores são bastante differentes; assim os trematodes de rãs brasileiras são, em parte, identicos ou muito proximos ás especies da Europa e da America do Norte, quando os hospedadores differem em genero ou pelo menos em especie. Os molluscos que servem de hospedadores intermediarios tambem pertencem a outras especies, mas entram nos mesmos generos e (como se dá tambem nos trematodes adultos) especies, visinhas na systematica, podem substituir-se. Assim tambem os numerosos trematodes de animaes domesticos introduzidos acharão em grande parte as condições necessarias para a conservação da sua especie. Não é para admirar então que grande proporção das minhas observações se refiram a formas mais ou menos conhecidas. Todavia os conhecimentos sobre a biologia dos trematodes são tão fragmentarios que a evolução completa é conhecida apena para um numero insignificante de especies, sendo ignorada, na sua maior parte, no caso de muitos parasitos communs de animaes domesticos. Assim qualquer contribuição á solução d'estes problemas não pode deixar de ser de grande interesse. Se os nossos conhecimentos deste assumpto são ainda tão atrazados, é isto devido não sómente ao pequeno numero de trabalhadores, mas tambem á difficuldades inherentes que precisam de um longo tirocinio, de muito tempo, bastante paciencia e alguma felicidade na procura do material de estudos.

Procura de trematodes em hospedadores adultos.

Tendo determinado os hospedeiros adultos facultativos de uma certa região, procura-se obter exemplares vivos ou mortos, para determinar os trematodes n'elles existentes. Convem em primeiro lugar fazer um exame das fezes para verificar se contêm

ovos de trematodes. Reconhecem-se pela presença de um operculo num dos polos que raras vezes falta. A forma é geralmente ovoide, podendo as vezes haver prolongamentos ou espinhos na casca. A côr do ovo é hyalina, amarellada, amarella, parda ou preta. Por dentro ha uma massa vitellina, contendo uma cellula que representa o verdadeiro ovo, ou pode haver já um embryão formado, caracterisado, ás vezes, por duas manchas pigmentadas, unidas ou separadas, que representam os olhos.

Os ovos que se encontram podem pertencer a trematodes do intestino, todavia, os ovos de especies do pulmão e das vias aereas tambem podem ser eliminados pelas fezes. De outro lado ha muitos trematodes, principalmente pequenos, cujos ovos não apparecem nas dejecções, porque o verme emigra com todos os ovos formados que depois são distribuidos no ambiente antes ou depois da morte do productor.

Tratando-se de animal morto, convem tambem verificar primeiramente se ha ovos no conteúdo da ultima parte do intestino. Depois examina-se methodicamente todo o tracto intestinal, as vias aereas e urinarias, a vesicula biliar, o figado e o pancreas. Tendo já observado o ovo, é preciso que se encontre o trematode adulto, mas este pode ser muito pequeno, ás vezes mesmo microscopico.

Tendo encontrado trematodes, examina-se os ovos, comparando-os com aquelles já observados nas dejecções. Os que não contêm embryão, devem ser incubados no ambiente até á formação do mesmo, o que se obtem isolando os ovos por lavagem e deixando-os depois em camara humida ou com pequena quantidade de agua. A formação do embryão costuma realizar-se num espaço de tempo variando de tres dias para tres semanas, em condições favoraveis de temperatura e sendo a camada de agua pouco grossa. Os ovos que já contêm embryão mostrão a mesma apparencia que os incubados.

Formação e sahida do embryão ou miracidio e penetração no primeiro hospedador.

O embryão geralmente só sahe quando ha luz e calor, de modo que nas culturas feitas no escuro se conservam dentro da casca. Expondo estes ao sol, pode-se observar, muitas vezes, já depois de pouco tempo a sahida de embryões ou miracidios em movimento activo. Em outros casos não se dá isso, porque os miracidios não são bem maduros ou porque só sahem da casca depois de serem engulidos pelo primeiro hospedador que é sempre um mollusco.

Para determinar este hospedador collocam-se ovos maduros ou miracidios num vidro de relogio junto com exemplares, de preferencia novos, de varios molluscos aquaticos. A's vezes, observa-se directamente a penetração atravez da pelle do mollusco, outras vezes são engulidos e penetram pelas membranas internas do systema respiratorio ou gastro-intestinal. Os miracidios depois da penetração viram sporocystos ou redias, nas quaes se formam as cercarias, depois de um intervallo regulando mais ou menos um mez. São então facilmente encontrados os sporocystos e redias, geralmente no figado e na glandula genital, ás vezes no rim e nos branchios dos molluscos; as cercarias encontram-se no mesmo lugar e na agua ambiente.

É importante saber que a penetração dos miracidios raras vezes tem lugar logo depois da sahida do ovo. Geralmente esta é seguida por um periodo de indifferença durante o qual a confrontação do miracidio e do mollusco não dá o resultado esperado. A ignorancia deste facto explica muitos insuccessos em investigações, aliás bem dirigidas.

Evolução dos miracidios nos primeiros hospedadores.

O numero dos miracidios que penetram mesmo nas condições anormaes das experiencias, é geralmente pequeno. Elles transformam-se logo em sporocystos novos; só no

caso dos monostomos dão sahida a uma pequena redia bem caracterisada que já está formada quando nasce o miracidio. Os sporocystos novos são difficilmente encontrados por causa de sua localisação, muitas vezes incerta, e da falta de caracteres distinctivos. Geralmente será mais conveniente esperar a formação de novas gerações de parthenitas. Estas, em ordem de frequencia, são encontrados no figado ou no testiculo e no ovario (muitas vezes reunidos em uma glandula só), mais raramente no rim ou nos branchios de certos molluscos. De um modo passageiro podem ser observados tambem em outros orgãos e tecidos.

Os sporocystos têm geralmente uma estructura tão simples que apenas se distinguem pela côr, pelo tamanho e pela forma; as redias são mais differenciadas, mas não permittem, na regra, uma determinação de especie. Esta torna-se mais facil pela producção das cercarias que, quasi sempre, é muito abundante, em compensação das enormes perdas de ovos, miracidios e das proprias cercarias, que somente em proporção bem restricta encontrarão as condições necessarias para o seu desenvolvimento ulterior.

As cercarias já são bastante differenciadas, menos pela estructura do corpo que pela forma enormemente variavel da cauda, que permitte logo distinguir maior numero de grupos. Dentro destes grupos pode se differenciar especies, baseadas sobre tamanho e forma geral, numero, tamanho e posição das ventosas, conformação do apparelho excretorio e muitos outros detalhes de estructura. A organisação já é bastante complicada, mas difficil de perceber, porque os tecidos e orgãos têm um caracter embryonario, predominando cellulas pouco differenciadas. Principalmente o apparelho intestinal é muitas vezes indistincto. Quanto ao apparelho genital é apenas esboçado quando não falta qualquer vestigio. Todavia o emprego de objectivos de immersão e um estudo paciente permitte perceber muitos detalhes que a principio não apparecem. Alguns autores parecem ter uma habilidade especial a perceber estructuras que não apparecem ao observador desprevenido. Isto explica-se por uma visão muito aguda, conhecimentos especiaes e muita paciencia; talvez pode, ás vezes, tambem entrar um pouco de imaginação. Em todos os casos as estructuras existentes tornar-se-hão mais distinctas, si se consegue acompanhar o desenvolvimento ulterior que se dá num novo hospedador definitivo ou intermediario.

Classificação das cercarias.

É muito conveniente classificar e denominar as cercarias, para facilitar o estudo dellas, mas tanto a classificação como os nomes são apenas provisorios. Os nomes só poderão ser considerados definitivos quando os adultos, obtidos das cercarias, ainda forem indescriptos; a classificação deve ser feita pelos adultos, conforme á praxe reconhecida; todavia os estados anteriores podem ser utilisados nella.

LUEHE deu uma classificação das cercarias que usarei na forma que lhe deu CORT (1915), apenas com algumas abbreviações; é sufficiente para todos os fins practicos.

A. Cercarias de *Gasterostomos:*
  Dous appendices compridos na extremidade caudal. Bocca no meio da face ventral. Intestino simples, em forma de sacco.
  Exemplo: *Bucephalus polymorphus* BAER.

B. Cercarias de *Monostomos:*
  Acetabulo falta.

C. Cercarias de *Amphistomos:*
  Acetabulo na extremidade posterior do corpo.

D. Cercarias de *Distomos:*
  Acetabulo distante da extremidade posterior.

LUEHE põe em primeiro lugar as *Lophocercarias* contendo apenas a *Lophocercaria cristata* LA VALETTE. Esta não mostra acetabulo e mesmo a ventosa cephalica parece modificada. A cauda é bifurcada. Considero quasi certo que corresponde a *Gigantobilharzia* ou outra forma proxima. Assim

pode ser considerada como forma anomala fazendo parte dos Distomos.

As *Holostomidas* não entram neste quadro, porque LUEHE, como quasi todos os autores, considerava a sua evolução abbreviada, faltando as parthenitas. Já expuz que verifiquei a existencia de parthenitas e cercarias de cauda bifurcada sendo a supposição de LUEHE errada.

Em seguida dou a classificação das cercarias de distomos em forma de chave:

Chave para as cercarias de Distomos.

1. Cercarias isoladas.. 2
   Cercarias reunidas pela cauda..... C. *symphytocercas*
2. Cauda bem formada 4
   Cauda truncada ou ausente.......... 3
3. Cauda abbreviada em forma de couto.. C. *microcercas*
   Cauda ausente..... *Cercariaeos*
4. Cauda sem pêlos.. 5
   Cauda com pêlos lateraes........... C. *trichocercas*
5. Cauda simples..... 6
   Cauda bifurcada... C. *dicranocercas*
6. Cauda não muito grossa........... 8
   Cauda muito grossa 7
7. O corpo pode ser recolhido dentro da base da cauda... C. *cystocercas*
   O corpo não pode ser recolhido.... C. *rhopalocercas*
8. Cabeça da cercaria armada ou com collar............ 9
   Cabeça inerme..... *Anoplocercarias*
9. Cabeça armada com estilete.......... *Xiphidiocercarias*
   Cabeça com collar e com uma colleira de espinhos (esta pode faltar ou apparecer apenas no estado cystico).......... *Echinocercasria*

Emprego as designações C. *dicranocercas* e *symphytocercas* em vez de C. *furcocercas* e *Rattenkoenigcercarien,* por ser a primeira mais correcta e a segunda mais facil de comprehender.

As *Cercarias symphytocercas* e *trichocercas* são raras e na maior parte marinhas, de modo que não é de extranhar que não as encontrei. Das outras tive occasião de observar muitos representantes, excluindo apenas as *microcercas* e os *Cercariaeos*. Discutirei rapidamente os grupos observados.

Das *C. dicranocercas* observei cerca de dez especies, repartidas sobre pelo menos em tres generos de hospedadores. Podem ser divididos em dous ou tres grupos, que parecem homogeneos, mas sem muita affinidade entre si.

As *C. cystocercas* tem como unico representante a *C. cystophora* do *Distomum ovocaudatum* VULPIAN, collocado hoje no genero *Halipegus*. A cercaria foi observada no Rio em *Planorbis confusus.*

Das *C. rhopalocercas* descobri uma nova especie muito interessante em *Semisinus* e outra em *Planorbis.*

De *Anoplocercarias* observei a *Cercaria* da *Fasciola hepatica* em pequenos *Lymnaeus* do Valle do Parahyba. Vi varias especies inermes que julgo deverem entrar nas *echinocercarias*, sendo que os distinctivos ainda não eram desenvolvidos.

As *xiphidiocercarias* são as cercarias mais abundantes. Foram observadas especies em *Planorbis, Spirulina, Physa, Lymnaea, Semisinus* e *Ampullaria.* Representam cerca de dez especies e dividem-se em dous grupos que parecem formados de especies muito visinhas.

Echinocercarias são muito frequentes e foram encontradas em *Planorbis, Physa, Spirulina* e *Semisinus.* O seu numero pode ser estimado levando em conta o grande numero de distomulos enkystados e distomos adultos com os caracteres das *Echinostomidas* que formam um dos maiores grupos dos trematodes indigenas.

As especies, observadas por mim em estado livre, chegam a mais de trinta. Addi-

cionando as formas enkystadas o numero é bastante maior.

As cercarias podem tambem ser classificadas pelas *parthenitas (sporocystos* ou *redias)*, em que nascem. A redia perfeita tem um orgão que se pode considerar ventosa buccal ou bulbo pharyngeo, e um intestino simples, em forma de sacco, de comprimento variavel; pode tambem haver uma abertura de parto, um collar e processos ambulatorios, o primeiro na metade cephalica, os ultimos na metade caudal. As redias são capazes de movimentos energicos. Os *sporocystos* mais simples são pequenos saccos esphericos ou ovaes, quasi sem estructura (fóra das cellulas germinativas) e sem movimento. Entre estes extremos ha todavia transições. As redias podem perder, pelo menos em estado adulto, o collar, os processos ambulatorios e quasi toda a mobilidade. O intestino e o orgão anterior podem tornar-se indistinctos e reduzidos. A abertura de parto falta muitas vezes. Do outro lado os *sporocystos* podem alongar-se muito e mostrar bastante mobilidade de modo que têm sido, ás vezes, confundidos com redias. Todavia um exame cuidadoso permitte sempre estabelecer a categoria.

Das cercarias, observadas por mim, as *xiphidiocercarias* nascem todas em *sporocystos* simples, curtos ou pouco allongados; as *dicranocercariae* são formadas em *sporocystos* muito compridos e moveis, mas um grupo que é caracterisado por manchas ocellares, provem de redias. Todas as outras cercarias nascem em redias que podem apresentar certos distinctivos, embora insufficientes para uma classificação das cercarias.

Dos outros trematodes observados, os *monostomes* tambem têm redias que representam uma forma mais perfeita e primitiva; os *sporocystos* secundarios correspondem a uma degeneração, muitas vezes observada em organismo parasitarios.

As redias primitivas nascem sempre de *sporocystos* primitivos; apenas os monostomos as mostram já formadas nos embryões ou miricidios antes da penetração.

Considerações sobre as cercarias.

Tenho ainda de fazer algumas considerações sobre as cercarias:

Como regra geral as cercarias não emigram durante a noite. A sahida é favorecida por calor e luz. Os raios solares são muito favoraveis, mas tambem se pode fazer uso de lampadas electricas ou luz diffusa e augmentar a temperatura da agua por qualquer meio.

Suppõe-se geralmente que a cauda das cercarias sirva apenas para a locomoção. Para este fim todavia é um instrumento muito imperfeito, porque as cercarias fazem pouco caminho em relação ao trabalho mechanico que parece exagerado. Os miracidios, apenas com cilios, obtêm um resultado muito melhor.

Todavia é preciso considerar que para muitas, talvez a maioria das cercarias os movimentos têm outra utilidade. Servem para despertar a attenção dos segundos hospedadores que consideram-nas como presa legitima. De facto é facil convencer-se que larvas de *agrionidae*, gyrinos e pequenos peixes engolem occasionalmente grande numero de cercarias. Encontrei uma vez um gyrino que, durante uma experiencia, tinha absorvido tantas dicranocercarias que parte do intestino estava completamente distendida por grande numero dellas que ainda mostravam movimentos continuos e energicos.

Pouco a pouco cheguei á conclusão (nova ou pelo menos não exposta na litteratura do assumpto) que a maioria das cercarias não penetram nos seus hospedadores pelo tegumento exterior, mas pelas membranas internas, depois de terem sido engulidas.

Isto é a regra para todas as especies que se hospedam em larvas de insectos nas quaes os kystos são geralmente encontrados perto do intestino. A pelle de certos molluscos e de gyrinos é tão molle que algumas cercarias a perfuram sem difficuldade, mas mesmo destas o maior numero entra por outro caminho. As cavidades internas usadas na respiração, como aquella do

pallio em certos molluscos e o recto das *Aeschnidas*, servem de entrada para as cercarias que são aspiradas com a agua.

A penetração da pelle dos mammiferos como é observada nos *schistosomos* é um facto raro que exige uma adaptação especial. Assim mesmo a penetração tambem se dá frequentemente pelas mucosas.

Os factos que acabam de ser expostos explicam porque os resultados das experiencias de infecção podem ser pouco certos, mesmo quando as condições de experiencia parecem favoraveis.

Enkystamento das cercarias.

Algumas cercarias enkystam-se logo no primeiro corpo solido que encontram no ambiente. Assim as cercarias da *Fasciola hepatica* enkystam-se na lamina ou no vidro de relogio, onde foi aberta a casca do mollusco hospedador, e ha cercarias de monostomos que se encontram enkystadas na propria casca do mesmo em numero bastante grande. O enkystamento neste caso começa logo, mas leva tempo para terminar, pois que nestas condições o kysto é formado de varias camadas tornando-se bastante grosso e opaco.

A maior parte das cercarias enkystamse num hospedador intermediario. Muitas vezes trata-se de um mollusco. Neste caso a cercaria pode regressar para o mesmo mollusco, depois de ter sahido, ou penetrar em outro individuo da mesma ou de outra especie. As *echinocercarias* têm muitas especies que se enkystam em molluscos e outras que preferem gyrinos onde cada um tem a sua localisação especial. As xiphidiocercarias escolhem larvas aquaticas ou gyrinos nos casos que observei.

Dentro do hospedador intermediario o enkystamento é assaz rapido, tanto mais que os kystos são geralmente finos, membranaceos.

A sua forma pode ser espherica ou ovoide, com ou sem espaço livre maior, conforme a especie. O systema excretorio enche-se no primeiros dias de granulos que são retidos e a sua forma e apparencia são os caracteres mais conspicuos dos kystos não completamente recentes. O xiphidio (que é conservado) pode muitas vezes ser reconhecido e nos kystos dos *echinostomos* a colleira de espinhos apparece ou se accentua mais.

Assim com alguma experiencia e tomando em conta a natureza do hospedador se consegue determinar o grupo e, muitas vezes, a especie das cercarias que formárão o kysto.

O trematode larval mostra-se, a principio, bastante movel dentro do kysto, tornando-se depois mais inerte. A sua evolução pode progredir algum tanto, mas para isso elle não precisa de alimento; mesmo em grande numero, os parasitos são bem supportados, se a invasão fôr successiva.

Os kystos podem ser obtidos experimentalmente ou pelo exame de hospedadores facultativos. Assim se observam muitas vezes distomos enkystados em molluscos, larvas, gyrinos e peixes, apanhados em lagoas onde ha passaros aquaticos; algumas vezes será possivel reconhecer o hospedador definitivo, depois de ter examinado os animaes que se alimentam com os hospedadores intermediarios.

Os detalhes que não se percebem nos trematodes enkystados, podem ás vezes ser reconhecidos em exemplares obtidos do kysto por compressão deste. O methodo requer bastante material porque os resultados são pouco certos.

Determinação do hospedador definitivo.

A determinação do hospedador definitivo é feita por experiencias helminthologicas. O estudo dos kystos e da fauna local com os parasitos, observados nella, permitte limitar as probabilidades, de modo que a experimentação pode ser restricta a poucas especies.

Ha varios modos de proceder, conforme os casos. Podendo-se excluir uma infecção previa do animal em experiencia, procura-se obter logo a forma adulta, o que ne-

cessita um tempo de tres a cinco semanas. A existencia de exemplares adultos pode, em muitos casos, ser revelada pelo apparecimento de ovos nas fezes.

O numero de adultos encontrados deve ser em relação com o dos kystos maduros que foram engulidos, o que geralmente acontece quando se acertou na supposição do hospedador definitivo. Se a ingestão foi repetida durante o periodo de espera, os exemplares encontrados devem mostrar um desenvolvimento correspondente aos differentes periodos.

Procurei obter o desenkystamento por digestão artificial, mas os resultados até agora fôram pouco satisfactorios. De outro lado pode se obter os trematodes livres deixando um animal appropriado engulir os kystos e examinando este depois de dez a quinze horas. Estas experiencias podem dar um resultado satisfactorio, mesmo quando não se empregou o legitimo hospedador final.

Appreciação das experiencias helminthologicas.

A solução dos problemas helminthologicos pela experimentação parece decisiva. Na pratica todavia encontram-se muitas difficuldades e fontes de erro, devido á ignorancia de muitos detalhes menores que influem sobre os resultados. Por isso as experiencias que não são absolutamente decisivas têm de ser repetidas varias vezes e os resultados devem ser constantes em circumstancias iguaes. Na falta de constancia é preciso procurar a causa dos insuccessos. De outro lado é necessario excluir que os parasitos encontrados sejam devidos a infecção espontanea, antes ou depois da experiencia.

O trabalho mechanico de procurar os parasitos obtidos pode ser muito difficil, principalmente quando se trata de especies microscopicas ou de formas muito novas. Por isso convem escolher os animaes de experiencia tão pequenos quanto possivel, e deixal-os em jejum algum tempo antes do exame.

Assim é possivel com pequenas rãs de examinar todo o intestino e pulmão debaixo do microscopio. Em vez de laminas e laminulas ha, muitas vezes, conveniencia de usar chapas de vidro maiores. Raspando com lamina, não polida nos lados, consegue-se fazer sahir de um pedaço de intestino todo o conteúdo, incluindo muitas vezes a mucosa; o resto do intestino pode ser examinado directamente por transparencia. Todas as visceras e secreções, obtidas numa autopsia, devem ainda ser lavadas e os liquidos usados submettidos a novo exame. Assim se pode, ás vezes, descobrir parasitos depois de um exame directo com resultado negativo. Não se deve esquecer que trematodes podem ser encontradas nas visceras, como pulmões, figado, pancreas e rins e nos canaes ligados a ellas, como tambem nos vasos de sangue, na bocca, nas cavidades nasaes e nos saccos aereos. Isto se refere tambem ao exame de animaes caçados cuja fauna parasitaria se deseja conhecer.

Quando não é possivel excluir uma infecção previa do animal de experiencia, faz-se o exame antes que os parasitas tenham tempo de chegar á maturidade completa. Encontrando então trematodes, que correspondem em numero e desenvolvimento aos kystos ingeridos, o resultado pode ser considerado positivo, principalmente se o animal não se podia infectar algum tempo antes da experiencia. A rapidez do desenvolvimento final depende do tamanho e desenvolvimento do trematode ingerido e da temperatura do sangue do hospedador. Nas aves o desenvolvimento parece mais rapido que nos mammiferos; nos animaes de sangue frio o crescimento nos primeiros dias é muito lento.

Ha alguns trematodes que podem desenvolver-se em varios hospedadores, que se alimentam do mesmo modo, sem serem affins. Todavia a maior parte dos parasitos não chega ao desenvolvimento completo senão nos hospedores legitimos. Differenças de especies não constituem geralmente um obstaculo, se os hospedadores pertencem ao mesmo genero ou a generos muito alliados.